

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07243

研究課題名（和文）雌性生殖管原基のCxxc5が制御する雄性生殖管の形態形成機構

研究課題名（英文）Mechanisms of male reproductive tract development regulated by Cxxc5 in the female reproductive tract primordium

研究代表者

原田 理代（Harada, Masayo）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師（キャリアアップ）

研究者番号：80555756

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：中腎管（将来の精巣上体、精管、精嚢、精管膨大部腺）と中腎傍管（将来の卵管、子宮、膈）は胎生期に雌雄同様に形成され、雄では中腎管が分化して中腎傍管が消失し、雌では中腎傍管が分化して中腎管が消失する。我々は中腎傍管で特異的にCxxc5を欠損させた雄マウスが不妊になることを発見した。本研究は、雄性不妊が将来消えゆくはずの雌性生殖管の発生異常によりもたらされる機構の解明を目的とした。中腎傍管特異的Cxxc5欠損雄マウスは、胎生期中腎傍管が伸長停止し高い位置で先端部が残存することが発端となり、精管から精嚢と精管膨大部腺が分岐する部位の構造が異常になり、精子が迂回し質が低下して不妊になると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

過去の研究では、雄性不妊の原因について雄性生殖管にのみ着目しているが、本研究は、雄性不妊が雌性生殖管（中腎傍管）の発生異常によりもたらされるという新機構を提唱するものである。中腎傍管特異的Cxxc5欠損雄マウスが示す中腎傍管の残存は、ヒトで、男性不妊をもたらす中腎傍管嚢胞の症例と類似している。しかしながら、なぜ男性で中腎傍管が残存するのか、女性生殖管原基である中腎傍管の残存がなぜ男性不妊をもたらすのか、その機序は分かっていない。よって、本研究が、ヒト男性不妊症である中腎傍管嚢胞の発症機序解明に貢献できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The Wolffian duct (future epididymis, vas deference, seminal vesicle, and ampullary gland) and Mullerian duct (future oviduct, uterus, and vagina) form similarly in males and females during embryonic development. In male embryo, the Mullerian duct degenerates and the Wolffian duct differentiates. Whereas, in female embryo, the Wolffian duct degenerates and the Mullerian duct differentiates. We revealed that the loss of Cxxc5 in the Mullerian duct induced distal Mullerian duct elongation defects and the Mullerian ductal tip persistence at abnormally rostral position leading to morphological defects of distal reproductive tract organs such as distal vas deference, seminal vesicle, and ampullary gland in male mice. The sperm were ejaculated through a detour in seminal vesicle, and thus might lost their fertility in those infertile mutant mice.

研究分野：発生生物学

キーワード：中腎管 中腎傍管 精管 精嚢 Cxxc5

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

雄性生殖管原基である中腎管(将来の精巣上体、精管、精囊)と雌性生殖管原基である中腎傍管(将来の卵管、子宮、膣)は、胎生期に雌雄同様に形成される。その後、雄では中腎管が分化して中腎傍管が消失し、雌では中腎傍管が分化して中腎管が消失する。過去の研究で、雌性生殖管原基である中腎傍管の伸長には雄性生殖管原基である中腎管からの伸長誘導が必要であることは証明されてきた。逆に中腎傍管が中腎管の分化に影響を与えるかどうかについては不明である。

CXXC5 たんぱく質は、12個の Zinc fingers CXXC-type 遺伝子ファミリーの1つで、細胞を用いた研究により、クロマチン脱アセチル化、p53の活性化、骨髄造血、筋細胞分化等に関与すると報告されている。また、*Cxxc5*欠損マウスを用いた解析により、CXXC5が骨芽細胞分化を負に抑制すること、皮膚創傷治癒を負に制御することが報告されている。我々は、CXXC5が中腎管と中腎傍管において強く発現し、中腎傍管で特異的に *Cxxc5* を欠損させた雄マウスが不妊になることを発見した。この結果は、これまで明らかにされてこなかった、中腎傍管が中腎管の分化に影響を与えている可能性を示唆している。

2. 研究の目的

本研究では、中腎傍管特異的 *Cxxc5* 欠損雄マウスの雄性生殖管の形態形成異常と不妊の分子機構を解明することで、雄性生殖管形成に対する雌性生殖管の協調的な発生機構を明らかにすることを目的とした。

過去の研究では、雄性不妊の原因について雄性生殖管にのみ着目しているが、本研究は、雄性不妊が雌性生殖管(中腎傍管)の発生異常によりもたらされるという新機構を提唱するものである。中腎傍管特異的 *Cxxc5* 欠損雄マウスが示す中腎傍管の残存は、ヒトで、男性不妊をもたらし中腎傍管嚢胞の症例と類似している。しかしながら、なぜ男性で中腎傍管が残存するのか、女性生殖管原基である中腎傍管の残存がなぜ男性不妊をもたらしするのか、その機序は分かっていない。本研究が、ヒト男性不妊症である中腎傍管嚢胞の発症機序解明につながり、生殖医療へ基盤知識を提供できることを期待して取り組んだ。

3. 研究の方法

(1) 中腎傍管特異的 *Cxxc5* 欠損雄マウスの生殖管形態異常解析

中腎傍管特異的 *Cxxc5* 欠損雄マウスの生殖管の形態異常について、成獣、生後3日目で、解剖学的手法と抗体染色法で解析した。

(2) 中腎傍管特異的 *Cxxc5* 欠損雄マウスの中腎傍管伸長停止の機構解明

中腎傍管特異的 *Cxxc5* 欠損雄マウスの中腎傍管伸長停止について、伸長停止直前の胎齢13.0~13.5日の中腎傍管先端部を採取し、各分子の発現量を解析した。

4. 研究成果

(1) 中腎傍管特異的 *Cxxc5* 欠損雄マウスの生殖管形態異常解析

生殖不能な中腎傍管特異的 *Cxxc5* 欠損雄成獣マウスでは、精管下部から精囊と精管膨大部腺が分岐する部位の形態異常が観察された。また、精囊への異所的な精子の流入が見られた。生殖可能な中腎傍管特異的 *Cxxc5* 欠損雄成獣マウスでは、精管から精囊及び精管膨大部腺が分岐する部位の形態異常と、精囊への精子流入がほぼ無かったことから、精管から精囊と精管膨大部腺が分岐する部位の構造異常が不妊の原因であると考えられた。

次に、より早い発生段階を解析した。生後3日目では、野生型雄マウスでも、精管遠位部で精管内側に小さな球状の中腎傍管が残存していたが、中腎傍管特異的 *Cxxc5* 欠損雄マウスでは、野生型に比べてより高い位置により大きな嚢胞状の中腎傍管が残存し、精管が中腎傍管嚢胞方向に屈曲していた。更に、残存中腎傍管より下位の精管が屈曲し、精管と精囊の分岐部構造の異常と精管からの膨らみである精管膨大部腺の形態異常が見られた。

これらの結果から、中腎傍管において CXXC5 の機能が失われると、中腎傍管の先端がより高い位置で残存し、雄マウスの中腎管遠位部の形態に異常が生じることが明らかになった。また、野生型雄マウスでも中腎傍管特異的 *Cxxc5* 欠損雄マウスでも、残存中腎傍管のすぐ近くに精管が配列する特徴がみられ、中腎傍管と中腎管の相互作用があるのではないかと推察された。

(2) 中腎傍管特異的 *Cxxc5* 欠損雄マウスの中腎傍管伸長停止の機構解明

組織学的解析により、胎齢14.5日目の中腎傍管特異的 *Cxxc5* 欠損雄マウスでは、中腎傍管が途中で伸長停止していた。生後3日目に、中腎傍管特異的 *Cxxc5* 欠損雄マウスでは、野生型に比べてより高い位置により大きな嚢胞状の中腎傍管が残存し、精管が中腎傍管嚢胞方向に屈曲していたことから、中腎傍管特異的 *Cxxc5* 欠損雄マウスの不妊の大元の原因は中腎傍管伸長途中停止であると考えられた。

そこで、中腎傍管の伸長停止について、原因を分子レベルで解析した。中腎傍管が伸長停止する直前の胎齢13.0~13.5日の中腎傍管先端部をレーザーマイクロダイセクションで採

取し、RNA-シーケンスを実施した。全転写産物の定量結果を正常雄マウスと比較し、CXXC5の標的分子を抽出した。抽出された分子の中には、CXXC5のターゲット分子であることが報告されているものも含まれていた。中腎傍管伸長停止の詳細な分子機構については、今後の解明課題となった。

以上の結果から、中腎傍管特異的 *Cxxc5* 欠損雄マウスは、胎生期中腎傍管が伸長停止し高い位置で先端部が残存することが発端となり、精管から精嚢と精管膨大部腺が分岐する部位の構造が異常になり、精子が異所的に迂回し質が低下して不妊になると考えられた。本研究により、中腎傍管が中腎管の分化に影響を与えるため、女性生殖管の発生異常が男性不妊の原因になりうるということが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Bird Anthony D, Croft Brittany M, Harada Masayo, Tang Lingyun, Zhao Liang, Ming Zhenhua, Bagheri-Fam Stefan, Koopman Peter, Wang Zhugang, Akita Keiichi, Harley Vincent R	4. 巻 29
2. 論文標題 Ovotesticular disorders of sex development in FGF9 mouse models of human synostosis syndromes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 2148 ~ 2161
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hmg/ddaa100	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Harada Masayo, Akita Keiichi	4. 巻 153
2. 論文標題 Mouse fibroblast growth factor 9 N143T mutation leads to wide chondrogenic condensation of long bones	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Histochemistry and Cell Biology	6. 最初と最後の頁 215 ~ 223
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00418-020-01844-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Muro Satoru, Kagawa Ryuzaburo, Habu Maika, Ka Hiromasa, Harada Masayo, Akita Keiichi	4. 巻 33
2. 論文標題 Coexistence of Dense and Sparse Areas in the Longitudinal Smooth Muscle of the Anal Canal: Anatomical and Histological Analyses Inspired by Magnetic Resonance Images	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Anatomy	6. 最初と最後の頁 619 ~ 626
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ca.23467	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Suriyut Janyaruk, Muro Satoru, Baramee Phichaya, Harada Masayo, Akita Keiichi	4. 巻 95
2. 論文標題 Various significant connections of the male pelvic floor muscles with special reference to the anal and urethral sphincter muscles	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anatomical Science International	6. 最初と最後の頁 305 ~ 312
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12565-019-00521-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Baramee Phichaya, Muro Satoru, Suriyut Janyaruk, Harada Masayo, Akita Keiichi	4. 巻 95
2. 論文標題 Three muscle slings of the pelvic floor in women: an anatomic study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anatomical Science International	6. 最初と最後の頁 47～53
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12565-019-00492-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Muro S., Tsukada Y., Harada M., Ito M., Akita K.	4. 巻 21
2. 論文標題 Anatomy of the smooth muscle structure in the female anorectal anterior wall: convergence and anterior extension of the internal anal sphincter and longitudinal muscle	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Colorectal Disease	6. 最初と最後の頁 472～480
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/codi.14549	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Masayo Harada, Keiichi Akita
2. 発表標題 Mouse fibroblast growth factor 9 N143T mutation leads to wide chondrogenic condensation of long bones
3. 学会等名 The 43rd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan MBSJ 2020 Online
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masayo Harada, Keiichi Akita
2. 発表標題 Mouse Fgf9N143T leads to cartilage widening, resulting in widened long bones
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 第98回日本生理学会大会合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原田理代、秋田恵一
2. 発表標題 線維芽細胞増殖因子9のN143T変異は長管骨の軟骨原基を太くする
3. 学会等名 第33回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松丸大輔、村嶋亜紀、宮川信一、原田理代、山田源、中西剛
2. 発表標題 三次元イメージング技術を用いた総排泄腔分割の解析：発生異常メカニズムの解明に向けて
3. 学会等名 フォーラム2020 衛生薬学 環境トキシコロジー
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Satoru Muro, Maika Habu, Hiromasa Ka, Ryuzaburo Kagawa, Masayo Harada, Keiichi Akita.
2. 発表標題 Coexistence of dense and sparse areas in longitudinal smooth muscle of the anal canal inspired by MRI
3. 学会等名 International Congress of Anatomia Clinica (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 室生暁, Junyaluk Suriyut, 原田理代, 秋田恵一.
2. 発表標題 男性骨盤底の中心領域における平滑筋構造の解析
3. 学会等名 第23回臨床解剖研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 秋田恵一, Bamee Phichaya, 室生暁, Suriyut Janyaruk, 原田理代.
2. 発表標題 女性の骨盤底に見られる3つの筋束(スリング)についての解剖学的研究
3. 学会等名 第21回日本女性骨盤底医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 室生暁, 羽生舞花, 夏博正, 加川隆三郎, 原田理代, 秋田恵一.
2. 発表標題 MRIで見られる肛門縦走平滑筋層における特徴的な構造の解析
3. 学会等名 第29回骨盤外科機能温存研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関